

Aus der Abteilung Endokrinpharmakologie
der Firma SCHERING AG, Berlin

Leiter: Professor Dr. F. Neumann

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANDROGENABHÄNGIGKEIT
DER FUNKTION DER ABDOMINALDRÜSE UND
PROSTATA AN DER MONGOLISCHEN WÜSTEN-
SPRINGMAUS (GERBIL), GEMESSEN AM NACHWEIS
SPEZIFISCHER BINDUNGSPROTEINE
FÜR ANDROGENE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Schwalm

Salzwedel 1977

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549010_0035

Aus der Abteilung Endokrinpharmakologie
der Firma SCHERING AG, Berlin

Leiter: Professor Dr. F. Neumann

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANDROGENABHÄNGIGKEIT
DER FUNKTION DER ABDOMINALDRÜSE UND
PROSTATA AN DER MONGOLISCHEN WÜSTEN-
SPRINGMAUS (GERBIL), GEMESSEN AM NACHWEIS
SPEZIFISCHER BINDUNGSPROTEINE
FÜR ANDROGENE



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Schwalm

Salzwedel 1977

Referent: Professor Dr. F. Neumann

Korreferent: Professor Dr. F. v. Bruchhausen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. Dezember 1976

INHALTSVERZEICHNIS

<u>I.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>Seite</u>
1.1	Die Haut und Anhangsorgane der Haut als Zielorgan für Hormone	1
1.2	Antiandrogene unter besonderer Berücksichtigung ihrer Wirkung auf die Haut und die Talgdrüsenfunktion	4
1.3	Der Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen unter besonderer Berücksichtigung der Rezeptormechanismen	11
1.3.1	Östrogenrezeptoren	12
1.3.2	Androgenrezeptoren	16
1.3.3	Molekularer Wirkungsmechanismus von Antiandrogenern	18
1.4	Problemstellung	20
<u>II.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>22</u>
2.1	Tiermaterial	22
2.2	Organ- und Cytosolgewinnung	22
2.3	Inkubation des Cytosols	23
2.4	Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung	23
2.5	Gelfiltration	24
2.6	Radioaktivitätsmessung	24
2.7	Angewandte Substanzen, Puffer und Lösungen	25
2.7.1	Markierte Substanzen	25
2.7.2	Nicht markierte Substanzen	25
2.7.3	Puffer und Lösungen	25
2.8	Radioimmunologische Bestimmung von Testosteron	26
2.8.1	Prinzip des Radioimmunoassays	26
2.8.2	Praktische Durchführung des Radioimmunotests für Testosteron	27
<u>III.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>30</u>
3.1	Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Rattenprostatae (100.000 g Überstand des Cytoplasmas)	30

	<u>Seite</u>
3.2 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Prostatagewebe des Gerbils	32
3.3 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Abdominaldrüsengewebe des Gerbils	34
3.4 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Uterus und Abdominaldrüsengewebe weiblicher Gerbils	34
3.5 Hormonbindungsversuche mit Blutplasma von männlichen und weiblichen Gerbils	36
3.6 Testosteronbestimmung im Plasma männlicher Ratten und Gerbils mittels des Radioimmunotests	36

IV. <u>DISKUSSION</u>	40
-----------------------	----

V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	43
---------------------------	----

VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	45
---------------------------------	----

VII. <u>DANKSAGUNG</u>	56
------------------------	----

VIII. <u>LEBENS LAUF</u>	57
--------------------------	----

I.

E I N L E I T U N G

1.1 Die Haut und Anhangsorgane der Haut als Zielorgan für Hormone

Endokrine Störungen gehen oft mit strukturellen und funktionellen Veränderungen der Haut einher (STRAUSS & POCHI 1963, LAWRENZE & WERTHESEN 1940). Dies gilt insbesondere für die Funktion der Talgdrüsen. Als endokrine Störungen seien hier der Hirsutismus, die Akne, die Seborrhoea oleosa und die Alopecia androgenetica genannt (Übersicht s. GRÄF, BROTHERTON & NEUMANN 1974).

Beim Menschen (STRAUSS & POCHI 1963, LAWRENZE & WERTHESEN 1940, POCHI, STRAUSS & MESCON 1962, STRAUSS & POCHI 1961, STRAUSS, KLINGMAN & POCHI 1962) sowie verschiedenen Versuchstieren - wie Ratten (EBLING 1957b, DE GRAAF 1943, EBLING 1957a, HASKIN, LASHER & ROTHMAN 1953), Mäusen (LAPIÈRE 1953), Goldhamstern (HAMILTON & MONTAGNA 1950), Kaninchen (MONTAGNA & KENYON 1949) - konnte gezeigt werden, daß Androgene das Talgdrüsenwachstum und die Talgdrüsenaktivität anregen.

Östrogene wirken hemmend (STRAUSS & POCHI 1963, EBLING 1957a, HOOKER & PFEIFFER 1943, EBLING 1948, EBLING 1951, EBLING 1954). Nach der Kastration nehmen die Talgdrüsen an Zahl und Größe ab (STRAUSS & POCHI 1963, EBLING 1957b). Vor Pubertätseintritt sind sie nur schwach entwickelt und wenig differenziert (STRAUSS & POCHI 1963).

Das Auftreten von Akne in der Pubertät wird in ursächlichem Zusammenhang mit dem starken Talgdrüsenwachstum gebracht, das durch die überschüssende Testosteronproduktion in dieser Entwicklungsphase bedingt ist (STRAUSS & POCHI 1963). Bei Frauen mit Nebennierenrindentumoren wird gehäuft Akne beobachtet (KEPLER, WATTERS & PIPER 1938), ebenso sollen Androgengaben an Frauen zur Entstehung der

Akne beitragen (GEIST, SALMON & GAINES 1938, GREENHILL & FREED 1939). Dies sind einige Beispiele die zeigen, daß Androgene für die Funktion der Talgdrüsen von physiologischer Bedeutung sind. Dabei stimulieren Androgene sowohl die Zellproliferation als auch die Talgdrüsensekretion. Es kommt zur Vergrößerung der Drüsenzellen (EBLING 1957b, HASHIN, LASHER & ROTIMAN 1953, ferner s. Übersicht bei NEUMANN & STEINBECK 1974).

Möglicherweise ist nicht Testosteron das wirksame Androgen in der Haut und in den Talgdrüsen, sondern die reduzierte Form dieses Androgens, das Dihydrotestosteron (darauf wird später noch im einzelnen eingegangen). So war es möglich, die 5α -Reduktase-Aktivität in den Talgdrüsen bzw. Haarfollikeln nachzuweisen (Übersicht s. bei GRÄF, BROTHERTON & NEUMANN 1974).

Das Enzym 5α -Reduktase ist verantwortlich für die Reduktion von Testosteron zum Dihydrotestosteron. Ganz offensichtlich ist in Talgdrüsen und Haarfollikeln auch die Synthese biologisch aktiver Androgene aus Vorläufern (Prekursoren) möglich. Immerhin ist in Talgdrüsenfollikeln das Enzym 3β -ol-Steroid-dehydrogenase nachweisbar (GRÄF & NEUMANN 1975). Diese an Ratten durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß terminale Biosyntheseschritte, wie sie in Abbildung 1 dargestellt werden, auch in peripheren Zielorganen für Androgene, wie in Talgdrüsen und Haarfollikeln, stattfinden können. Das Enzym 3β -ol-Steroid-dehydrogenase ist verantwortlich für die Bildung von Δ^4 -3-Keto-steroiden aus Δ^5 -3-Hydroxy-Verbindungen, also zum Beispiel für die Bildung von Androstendion aus Dehydroepiandrosteron. Dehydroepiandrosteron ist ein biologisch nahezu unwirksames Androgen. Androstendion ist bereits androgen-wirksam und kann sehr leicht in Testosteron umgewandelt werden.

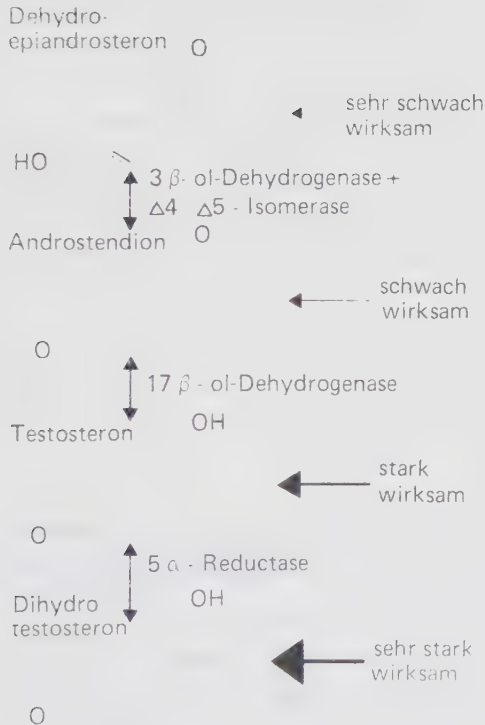


Abb. 1 Schematische Darstellung einiger terminaler Schritte der Androgenbiosynthese mit entsprechenden Hinweisen zur relativen biologischen Wirksamkeit (GRAF & NEUMANN 1975)

Es war also naheliegend, bei Erkrankungen, wie dem Hirsutismus und der Akne, bei denen eine gesteigerte Androgensekretion oder Androgenempfindlichkeit (was noch zu beweisen wäre) als wesentlicher Kausalfaktor anzunehmen ist, die Symptomatik durch Hemmung der Androgenbildung oder der Androgenwirkung günstig zu beeinflussen. Der günstige

Einfluß von Östrogenen bei diesen Erkrankungen ist seit langem bekannt und soll hier nicht näher diskutiert werden. Östrogene hemmen via negative Rückkopplung auf das Hypophysenzwischenhirnsystem die Gonadotropinsekretion und damit auch die Androgenproduktion. Dies gilt zumindest für den Mann. Daneben üben sie aber auch direkte Effekte auf die Talgdrüsenfunktion aus. Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, daß Östrogene nicht die Mitoserate in den Talgdrüsen hemmen, gleichgültig ob die Tiere gleichzeitig mit einem Androgen behandelt werden oder nicht (EBLING 1957a, EBLING 1967), sondern die intrazelluläre Talgsynthese. Größere Bedeutung für die Therapie der genannten Erkrankungen dürfte in Zukunft den Antiandrogenen zukommen. Darauf soll im nächsten Abschnitt kurz eingegangen werden.

Antiandrogene unter besonderer Berücksichtigung ihrer Wirkung auf die Haut und die Talgdrüsenfunktion

Antiandrogene sind Antagonisten der natürlichen und synthetischen männlichen Sexualhormone, der Androgene. Es handelt sich stets um synthetische Stoffe. Alle bisher gefundenen Antiandrogene, von denen der Wirkungsmechanismus bekannt ist, sind kompetitive Hemmer der Androgene (siehe auch später).

Definitionsgemäß werden nur solche Substanzen als Antiandrogene bezeichnet, die die Wirkung von Androgenen im Zielorgan verhindern, nicht aber Substanzen, die via Hemmung der Androgensynthese wirksam sind, gleichgültig ob sie wie Östrogene über eine negative Feedback-Wirkung auf das Hypophysenzwischenhirnsystem die Androgensynthese hemmen oder ob eine direkte Wirkung am Syntheseort selbst vorliegt. Die bekanntesten Antiandrogene sind Steroidhormone wie Cyproteronacetat, Cyproteron, 17α -Methyl-B-Nortestosteron, Δ^1 -Chlormadinonacetat, aber auch eine

nicht-steroidale Verbindung, Flutamid, erwies sich als ein sehr starkes Antiandrogen. Die Strukturformeln einiger bekannter Antiandrogene werden in Abbildung 2 wiedergegeben.

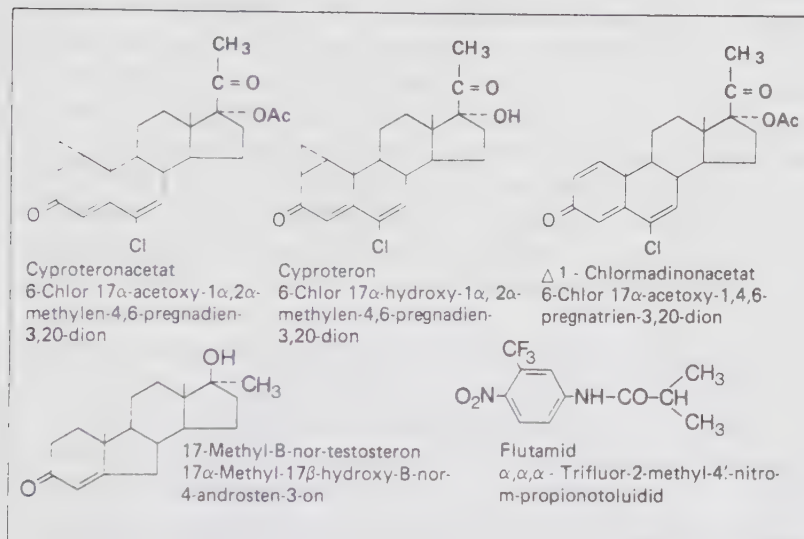


Abb.2 Strukturformeln einiger bekannter Antiandrogene

Antiandrogene beeinflussen alle Funktionen und Organsysteme, die in irgendeiner Weise androgen-abhängig sind. Da Androgene neben sexualspezifischen auch sexualunspezifische Wirkungen haben, trifft das gleiche auch für Antiandrogene zu.

Zu den sexualspezifischen Wirkungen der Androgene - und damit auch der Antiandrogene - gehört die Wirkung auf die accessorischen Geschlechtsdrüsen, Prostata, Samenblasen, Koagulationsdrüsen, Präputialdrüsen, die Wirkung auf Nebenhoden, Samenleiter und den Hoden selbst.

Es kommt unter dem Einfluß von Antiandrogenen zu einer Atrophie der accessorischen Geschlechtsdrüsen und zu regressiven Veränderungen am Nebenhoden und Samenleiter. Antiandrogene, wie das Cyproteronacetat, die zusätzlich gestagene und damit antigonadotrope Eigenschaften besitzen, hemmen die Spermatogenese (s. Übersicht NEUMANN 1971/72). Auch Libido und Potenz sind androgenabhängig und werden - von einigen Ausnahmen abgesehen - durch Antiandrogene unterdrückt. Cyproteronacetat wird zur Therapie der pathologischen Hypersexualität und Therapie von Sexualdeviationen klinisch angewandt (s. Übersicht RASPÉ 1972). Der Eintritt der Pubertät kann nach Behandlung mit einem Antiandrogen zeitlich beliebig lang hinausgeschoben werden (STEINBECK & NEUMANN 1971).

Zu den sexualspezifischen Wirkungen der Antiandrogene gehört auch die Beeinflussung der männlichen Foetaldifferenzierung. Werden Antiandrogene in der Phase der männlichen Differenzierung wirksam, was der Fall ist bei Behandlung gravider Tiere in der entsprechenden Schwangerschaftsphase, dann ist die männliche Sexualdifferenzierung gestört. Es resultiert eine ganz bestimmte Form der Intersexualität, die in der Humanmedizin unter der Bezeichnung "testikuläre Feminisierung" oder "hairless women" bekannt ist (s. Übersichten NEUMANN, VON BERSWORDT-WALLRABE, ELGER, STEINBECK, PAHN & KRAMER 1970, NEUMANN, ELGER & STEINBECK 1970).

Zu den wichtigsten nicht-sexualspezifischen Wirkungen der Antiandrogene gehören die Wirkungen auf die Haut und Anhangsorgane der Haut, vor allem die Hemmung der Talgdrüsenfunktion sowie die Verzögerung der Knochenreifung und des Knochenlängenwachstums.

Auf die Wirkungen der Antiandrogene auf Haut und Anhangsorgane der Haut sei näher eingegangen.

NEUMANN und ELGER (1966) konnten zeigen, daß es nach Behandlung von männlichen Mäusen oder kastrierten und androgen-substituierten männlichen Mäusen mit Cyproteronacetat zu einer drastischen Hemmung der Talgdrüsensekretion kommt. In dieser Studie wurde in Rückenhautschnitten die Zahl der Alveolen, die Zahl der Drüsenzellen pro Alveole sowie der Durchmesser der Talgdrüsenzellen ermittelt. Mittels dieser Werte konnte das Talgdrüsenvolumen errechnet werden. Es wurde gezeigt, daß die Behandlung mit 1 mg Cyproteronacetat - jeden 2. Tag - in 4 Wochen zu einer 80 %igen Abnahme der Talgdrüsenvolumina führt. Die stimulierende Wirkung von Testosteronpropionat auf die Talgdrüsenfunktion wird durch gleichzeitige Gabe des Antiandrogens vollständig aufgehoben. Andere Antiandrogene, wie 17 α -Methyl-B-Nortestosteron und 6 α ,6 β -Aethylen-17 α -Methyl-B-Nortestosteron, verhalten sich analog (SAUNDERS & EBLING 1969, EBLING 1970a). Die zuletzt genannten Untersuchungen wurden an Ratten durchgeführt. Gemessen wurde die Sebumproduktion und die mitotische Aktivität der Talgdrüsenzellen. Im Gegensatz zu den Östrogenen hemmen Antiandrogene vor allem die Mitoserate und damit die Zellproliferation. Dies trifft zumindest zu für Cyproteronacetat (EBLING 1970a), Δ^1 -Chlormadinonacetat (EBLING 1970b) und 17 α -Methyl-B-Nortestosteron (EBLING 1967).

EBLING (1973) konnte zeigen, daß sich die Effekte auf die Talgdrüsenfunktion bei simultaner Gabe von Cyproteronacetat und Oestradiol addieren. Dies ist auch insofern nicht verwunderlich, als ja Östrogene und Antiandrogene über verschiedene Mechanismen wirken.

Ein im Aufbau und Sekretionsmodus den Talgdrüsen vergleichbares Organ sind die Präputialdrüsen. Die Präputialdrüsenfunktion ist deshalb durch Androgene stimulierbar und durch Antiandrogene hemmbar. Die Präputialdrüsen stellen einen sehr guten Parameter dar, um den Einfluß von Androgenen oder Antiandrogenen - oder Pharmaka überhaupt -

auf die Talgdrüsenfunktion zu testen (JONES & WOODBURY 1964, HAMADA, NEUMANN & JUNKMANN 1963, JUNKMANN & NEUMANN 1964, NEUMANN & ELGER 1966, NEUMANN & KRAMER 1964, NEUMANN, RICHTER & GÜNZEL 1965).

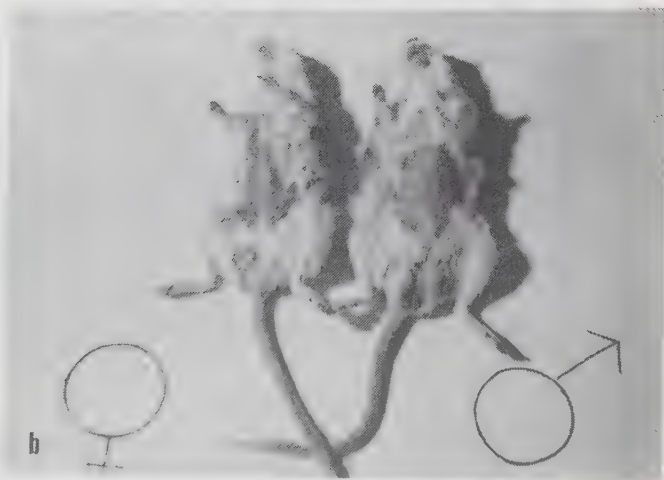
Auch das sogenannte Flankenorgan des Hamsters (Costovertebralorgan) kann als Parameter benutzt werden. Dieses Organ ist paarig angelegt und entspricht einer großen Talgdrüse. Für die ausgeprägte Androgenabhängigkeit spricht der Befund, daß das Costovertebralorgan bei männlichen Tieren sehr viel stärker ausgeprägt ist als bei weiblichen Tieren (BURDICK & HILL 1970, FROST & GOMEZ 1972).

BURDICK und HILL (1970) haben dieses Modell benutzt, um die lokale Wirkung verschiedener Antiandrogene zu testen. Untersucht wurden Cyproteronacetat, Δ^1 -Chlormadinonacetat, Chlormadinonacetat und Δ^1 -Chlormadinon-16,17-acetonid.

Gut geeignet für die Testung von Substanzen respektive Hormonen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Talgdrüsenfunktion ist auch die Abdominaldrüse der mongolischen Wüstenspringmaus, des Gerbils (*Meriones unguiculatus*) (GLENN & GRAY 1965). Diese Drüse ist ein scharf begrenzter Hautbezirk im unteren Drittel des Abdomens und besteht aus 200 bis 300 tubulo-alveolären Einzeldrüsen. Bei männlichen Tieren entwickelt sich der Drüsenkomplex im Alter von 8 bis 12 Wochen durch eine mächtige Hypertrophie bestimmter Talgdrüsen, die von Haarfollikeln ausgehen.

Bei weiblichen Tieren setzt die Entwicklung der Drüsen später ein und bleibt zeitlebens in der Größe hinter der der männlichen Individuen zurück (s. dazu Abbildungen 3 und 4).

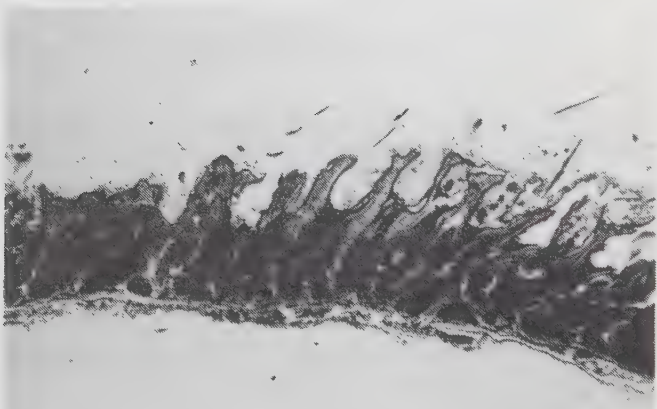
Die Entwicklung der Drüse im Verlauf der Pubertät, die stärkere Ausbildung beim männlichen Geschlecht sowie die Atrophie nach Kastration sprechen für die ausgeprägte Androgenabhängigkeit dieses Organs. Durch Androgensubstitution kann die Atrophie nach Kastration vermieden werden (s. Abbildung 4).



- Abb. 3
- a) Die Mongolische Wüstenspringmaus. Gerbils sind nicht voll domestiziert und zeichnen sich durch ausgesprochene Unruhe aus.
 - b) Die Abdominaldrüse liegt direkt auf der Linea alba, sie entwickelt sich erst im Zuge der Pubertät und ist bei männlichen Tieren stärker ausgeprägt als bei weiblichen.



a



b

Abb.4 Histologischer Schnitt durch die Abdominaldrüse männlicher Gerbils.

- a) Unbehandelte männliche Kontrolle.
Das Drüsengewebe ist rot dargestellt.
- b) Bild nach Kastration.
Man erkennt die ausgeprägte Atrophie des
Drüsengewebes - ein Zeichen für die
Hormonabhängigkeit dieses Organs.

Nach Behandlung mit Cyproteronacetat kommt es bei den männlichen Tieren zu einer Gewichtsabnahme dieser Drüse (NEUMANN 1971/72). Auch die stimulierende Wirkung von Testosteronpropionat auf die Abdominaldrüse kastrierter männlicher Gerbils kann durch gleichzeitige Behandlung mit Cyproteronacetat wieder weitgehendst aufgehoben werden. Interessanterweise nimmt das Gewicht dieser Drüse auch bei weiblichen Tieren nach Behandlung mit Cyproteronacetat ab. Auch bei weiblichen Tieren ist die stimulierende Wirkung von Androgenen auf dieses Organ durch gleichzeitige Behandlung mit Cyproteronacetat hemmbar.

Es war das Ziel dieser Untersuchung, durch Nachweis spezifischer Bindungsproteine für Androgene nähere Einzelheiten über den Wirkungsmechanismus von Androgenen und Antiandrogenen speziell in diesem Organ zu erlangen (s. auch Problemstellung).

Zum besseren Verständnis soll deshalb in den nachfolgenden Abschnitten ganz allgemein über den Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen berichtet werden, unter besonderer Berücksichtigung von Rezeptormechanismen. In diesem Zusammenhang wird dann auch der molekulare Wirkungsmechanismus von Antiandrogenen - soweit er bisher bekannt ist - diskutiert.

Der Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen unter besonderer Berücksichtigung der Rezeptormechanismen

Über viele Jahre glaubte man, daß die Hormonwirkung in einer Enzyminduktion besteht. Diese Vorstellung ist auch heute nicht als völlig unzutreffend anzusehen, obwohl sie nur einen Teilaspekt zum Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen widerspiegelt.

Welche Voraussetzungen müssen gegeben sein, damit ein Hormon wirkt?

- 1) Ist die Wirkung von Steroidhormonen an das Vorhandensein von intakten Zellen gebunden, d.h. sie wirken nicht in zellfreien Systemen;
- 2) wissen wir, daß Steroidhormone direkt am genetischen Material eingreifen;
- 3) von einigen möglichen Ausnahmen abgesehen, tritt die Wirkung von Steroidhormonen nur in Organen auf, die spezifische Rezeptoren aufweisen, die das Steroidhormon zu binden vermögen;
- 4) besteht die Wirkung von Steroidhormonen letztlich in der Synthese bestimmter Proteine, Nukleinsäuren oder Enzyme.

Auf die umfangreichen Untersuchungen zum Einfluß von Steroidhormonen auf zelluläre Stoffwechselaktivitäten, einschließlich der Gentranscription (RNS-Synthese) und Translation (Proteinsynthese), kann hier nicht eingegangen werden. Es sei deshalb auf einige Bücher und Übersichtsartikel hingewiesen (WILLIAMS-ASHMAN 1965, TATA 1966, LITWACK 1970, LITWACK 1972, SMELLIE 1971, MCKERNS 1971, MCKERNS 1974, RASPÉ 1971, PASQUALINI & SCHOLLER 1972, KARLSON & SEKERIS 1973, O'MALLEY & MEANS 1973, PITOT & YATVIN 1973, RICKENBERG 1974, NIU & SEGAL 1974).

1.3.1 Ostrogenrezeptoren

Auf die Existenz von Rezeptormolekülen für Steroidhormone in Zielorganen wurde erstmals 1962 von JENSEN und JACOBSEN hingewiesen. JENSEN und JACOBSEN konnten nach Injektion von ^3H -markiertem Östradiol in inmaternen Ratten zeigen, daß die Radioaktivität in Erfolgsorganen für Östrogene - z.B. in der Vagina oder im Uterus - über einen sehr viel längeren Zeitraum nachweisbar ist als in anderen Organen - z.B. in der Muskulatur, den Nieren, der Leber bzw. im Blut. In den letztgenannten Organen bzw. im Blut

war die höchste Radioaktivität bereits eine Viertelstunde nach Injektion erreicht, sie sank dann rasch und kontinuierlich ab. In der Muskulatur und im Blut waren etwa 1 bis 2 Stunden nach der ^3H -Injektion kaum mehr nachweisbare Mengen an Radioaktivität vorhanden. Umgekehrt wurde die maximale Radioaktivität in den Erfolgsorganen für Östrogene (Uterus, Vagina) erst 1 bis 2 Stunden nach der Injektion erreicht. Der Abfall erfolgte entsprechend langsam, und selbst 6 Stunden nach Östrogen-Applikation war die Radioaktivität in Uterus und Vagina noch hoch. Die Retention - nicht aber die Aufnahme von Östrogenen - erreicht einen Sättigungspunkt, wenn ansteigende Östrogendosen verabreicht werden. Dies ist der Beweis dafür, daß die Zahl der spezifischen Bindungsstellen mit hoher Affinität für Östrogene limitiert ist (JENSEN, DE SOMBRE & JUNGBLUT 1967, JENSEN, DE SOMBRE, HURST, KAWASHIMA & JUNGBLUT 1967). Die Bindung ist spezifisch. Nur biologisch östrogen-wirksame Steroide und Nichtsteroidoide, wie Diaethylstilboestrol, bzw. Antagonisten der Östrogene werden in den Erfolgsorganen für Östrogene gebunden und retiniert (CALLANTINE, CLEMENS & SHIH 1968, KAHWANAGO, HEINRICHS & HERRMANN 1970, GEYNET, MILLET, TRUONG & BAULIEU 1972, JENSEN, JACOBSON, SMITH, JUNGBLUT & DE SOMBRE 1972).

Untersuchungen mit Zellfraktionen haben gezeigt, daß ^3H -markiertes Östradiol hauptsächlich in den Zellkernen retiniert wird (TALWAR, SEGAL, EVANS & DAVIDSON 1964, TALWAR SOPORI, BISWAS & SEGAL 1968, NOTEBOOM & GORSKI 1965, JENSEN, SUZUKI, KAWASHIMA, STUMPF, JUNGBLUT & DE SOMBRE 1968). In autoradiographischen Untersuchungen konnte dieser Befund bestätigt werden (STUMPF 1969).

Ein Proteincytosolrezeptor wurde erstmals von TALWAR und Mitarbeitern 1964 nachgewiesen (TALWAR, SEGAL, EVANS & DAVIDSON 1964).

TOFT und GORSKI (1966) konnten dann mittels Ultrazentrifugation an einem Sucrosegradienten nachweisen, daß der Östradiol-Protein-Komplex als diskrete Bande sedimentiert, und zwar mit einem Sedimentationskoeffizienten von 9.5 S (ERDOS 1968, ROCHEFORT & BAULIEU 1968, KORENMAN & RAO 1968). Es zeigte sich, daß dieses Protein identisch ist mit der 8-S-Komponente, die später von anderen Untersuchern beschrieben wurde (JUNGBLUT, HATZEL, DE SOMBRE & JENSEN 1967, PUCA & BRESCIANI 1968). Das an die Kernfraktion gebundene Östradiol scheint an ein Protein gebunden zu sein, das mittels Extraktion mit 0.3 bis 0.4 M KCl, bei einem pH von 7.4 bis 8.5, solubilisiert werden kann (JUNGBLUT, HATZEL, DE SOMBRE & JENSEN 1967, PUCA & BRESCIANI 1968). Der solubilisierte Östradiol-Rezeptor-Komplex sedimentiert bei ungefähr 5 S.

Man nimmt heute an, daß der Cytosolrezeptor nach Aktivierung (Hormonbindung) eine Transformation - die Sedimentationskonstante ändert sich von 4 S auf 5 S - und in einem temperaturabhängigen Prozess Translokation in den Zellkern erfährt (s. Abbildung 5) (JENSEN, MOHLA, BRECHER & DE SOMBRE 1973). Man spricht von Zweischritt-Translokations-Mechanismus (two step translocation mechanism). Der Hormon-Kernrezeptor-Komplex löst dann die eigentliche Hormonwirkung aus, also die Synthese der messenger RNS (mRNS) unter der Einwirkung der RNS-Polymerase (Transcription), und somit indirekt die Proteinsynthese an den Ribosomen (Translation).

Es gibt also östrogen-bindende Rezeptoren sowohl im Zellplasma (Cytosol) als auch im Zellkern.

Schematische Darstellung der Östradiol (E₂)-Rezeptorbindung und der Hormonwirkung

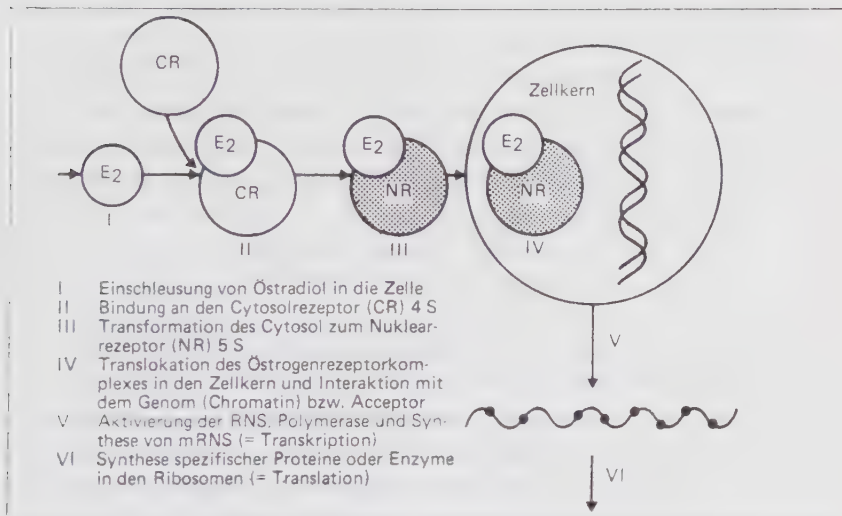


Abb. 5 Schematische Darstellung der Östradiol-Rezeptorbindung und der Hormonwirkung

In der Zwischenzeit wurden in zahlreichen Organen spezifische Östrogenrezeptoren nachgewiesen, so z.B. im Ovar, den Milchdrüsen, der Hypophyse, im Hypothalamus. Aber auch in Organen, von denen man nicht vermutete, daß Östrogene von physiologischer Bedeutung sein könnten, ließen sich Östrogen-Rezeptoren nachweisen, z.B. in der Niere, im Pankreas (SANDBERG, KIRDANI, VARKARAKIS & MURPHY 1973) und im Hoden (BRINKMANN, MULDER, LAMERS-STALHOFEN, MECHEISEN & VAN DER MOLEN 1972).

1.3.2 Androgenrezeptoren

Untersuchungen von PEARLMAN und PEARLMAN (1961) und HARDING und SAMUELS (1962) an Ratten haben gezeigt, daß die Prostata in der Lage ist, unkonjugierte Androgene zu retinieren. In einer ganzen Reihe von Untersuchungen Ende der 60er Jahre konnten diese Befunde - unter Verwendung von hochradioaktivem Testosteron (^3H) - bestätigt werden. Radioaktives Testosteron wurde in der ventralen und dorsalen Prostata, in den Samenblasen und den Koagulationsdrüsen retiniert. Im Blut und in den anderen Organen, wie der Milz, Lunge und im Thymus, verschwand dagegen die Radioaktivität verhältnismäßig rasch (TVETER & ATTRAMADAL 1968, TVETER & AAKVAAG 1969, ANDERSON & LIAO 1968, FANG, ANDERSON & LIAO 1969, BRUCHOVSKY & WILSON 1968, BELHAM, NEAL & WILLIAMS 1969, MAINWARING 1969).

In den Erfolgsorganen für Androgene ist die Radioaktivität bis zu 16 Stunden nach der Injektion nachweisbar. Interessant und wichtig ist nun die Beobachtung von FANG und Mitarbeitern, daß die gesamte retinierte Radioaktivität nach Zufuhr von Testosteron als Dihydrotestosteron identifiziert werden konnte (FANG, ANDERSON & LIAO 1969). Die lange Retention von Dihydrotestosteron in Prostata, Samenblasen und Koagulationsdrüsen beruht auf einer selektiven Retention dieses Androgens in den Zellkernen. Dies ist nicht der Fall in anderen Organen, wie der Leber, im Thymus oder dem Zwerchfell. Dieses Phänomen ist bereits wenige Minuten nach Zufuhr von ^3H -markiertem Testosteron zu beobachten (BRUCHOVSKY & WILSON 1968, ANDERSON & LIAO 1968). Es war speziell dieser Befund, der dazu führte, daß man nicht mehr Testosteron, sondern Dihydrotestosteron als das in der Zelle wirksame Androgen ansah (WILSON & GLOYNA 1970, LIAO & FANG 1969). Tatsächlich ist Dihydrotestosteron an der Prostata etwas stärker wirksam als Testosteron.

1970 gelang es LIAO und FANG (1970) zwei verschiedene Rezeptorproteine im Cytosol der ventralen Rattenprostata nachzuweisen. Sie wurden als α - und β -Proteine bezeichnet und lassen sich durch Ammoniumsulfatfraktionierung und durch Gel-Filtration trennen. Beide Proteine sind in der Lage, mit Dihydrotestosteron einen Komplex zu bilden.

α -Protein + DHT = Komplex I

β -Protein + DHT = Komplex II

Beide Proteine haben einen Sedimentationskoeffizienten von etwa 3.5 S. Die α -Protein-Fraktion bindet nicht nur spezifisch Dihydrotestosteron, sondern auch Progesteron und Östradiol, wobei allerdings nicht geklärt ist, ob die Bindung der verschiedenen Steroide an verschiedenen Orten geschieht oder an ein und demselben Ort. Das β -Protein dagegen bindet hochspezifisch nur 5 α -Dihydrotestosteron (LIAO, THYMOCZKO, LIANG, ANDERSON & FANG 1971).

Steroide - wie Testosteron, Cortisol, Progesteron und Östradiol - binden nicht. Beide Komplexe haben eine Sedimentationskonstante bei 3 bis 3.5 S, aber nur der Komplex II bildet bei einer Temperatur von 0 bis 2° C Aggregate und nur der Komplex II - also das β -Protein -, nicht aber der Komplex I wird zu dem 3-S-Steroid-Rezeptor-Komplex, der in der Prostatazellkernfraktion retiniert wird.

Die Menge an Rezeptorproteinen für Dihydrotestosteron in der Prostatazelle nimmt bei Ratten nach Kastration ab (MAINWARING 1970, BAULIEU & JUNG 1970, MAINWARING & MANGAN 1973, LIAO, THYMOCZKO, LIANG, ANDERSON & FANG 1971). Die Verarmung an Rezeptorproteinen geht in etwa parallel mit der Regression der Prostata nach Kastration.

Man kann heute davon ausgehen, daß das Dihydrotestosteron-Rezeptorprotein von Bedeutung ist für die Androgenwirkung in einer ganzen Reihe verschiedener Gewebe. Dafür spricht

einfach der Befund, daß ähnliche Proteine in vielen androgen-empfindlichen Geweben, wie den Samenblasen, den Haarfollikeln, Talgdrüsen und Präputialdrüsen, den Nieren, der Submandibulardrüse, dem Gehirn sowie verschiedenen androgen-abhängigen Tumoren gefunden wurde (TVETER & UNHJEM 1969, STERN & EISENFELD 1969, LIAO, THYMOCZKO, LIANG, ANDERSON & FANG 1971, FAZEKAS & SANDOR 1973, ADACHI & KANO 1972, EPPENBERGER & HSIA 1972, BULLOCK & BARRIN 1970, MAINWARING & MANGAN 1973, GEHRING, TOMKINS & OENO 1971, RITZÉN, NAYFEH, FRENCH & ARONIN 1972, GOLDSTEIN & WILSON 1972, DUNN, GOLDSTEIN & WILSON 1973). Andererseits sprechen heute eine Reihe von Fakten dafür, daß nicht in allen Fällen bzw. in allen Organen die Bildung des Dihydrotestosteron-Rezeptor-Komplexes für die Auslösung der androgenen Aktivität erforderlich ist. Es seien hier nur zwei Beispiele genannt:

Nach Kastration von Ratten erlöschen Libido und Potenz. Libido und Potenz lassen sich bei solchen Tieren durch Behandlung mit Testosteron wieder induzieren, nicht aber durch Dihydrotestosteron (WHALEN & LUTTGE 1971b, BEYER, LARSSON, PÉREZ-PALACIOS & MORALI 1973).

Auch das sogenannte "early androgen syndrome" (EAS) von Ratten läßt sich nicht durch Behandlung mit Dihydrotestosteron erzeugen, wohl aber durch Gabe von Testosteron (WHALEN & LUTTGE 1971a).

Es ließen sich hierzu noch mehr Beispiele anführen.

1.3. Molekularer Wirkungsmechanismus von Antiandrogenen

Wie bereits ausgeführt, handelt es sich bei dem Wirkungsmechanismus von Antiandrogenen um einen kompetitiven Androgen-Antagonismus an den Erfolgsorganen. In biologischen Testen ist dies am einfachsten dadurch zu beweisen, daß es auch möglich ist, die Wirkung exogen zuge-

fürter Androgene zu inhibieren (s. Übersicht NEUMANN & STEINBECK 1974). Auf molekularer Ebene waren verschiedene Mechanismen denkbar. So könnte z.B. die Einschleusung von Androgenen in die Zelle selbst behindert sein. Dies ist aber eindeutig nicht der Fall, wie Untersuchungen von WHALEN und Mitarbeitern gezeigt haben (WHALEN, LUTTGE & GREEN 1969).

Die Aufnahme von ^3H -markiertem Testosteron in die Samenblasen von cyproteronacetat-vorbehandelten Ratten war gegenüber den nicht-vorbehandelten Tieren nicht verändert. Schließt man sich der Vorstellung verschiedener Autoren an, daß nicht Testosteron, sondern immer nur Dihydrotestosteron das wirksame Androgen ist, dann könnte auch eine Hemmung der 5α -Reduktase-Aktivität als Wirkungsmechanismus für Antiandrogene in Frage kommen. In einer ganzen Reihe von Untersuchungen, von denen hier nur einige genannt seien, konnte aber gezeigt werden, daß die 5α -Reduktase-Aktivität durch Antiandrogene nicht beeinflußt wird (WALSH & KORENMAN 1971, STERN & EISENFELD 1969, VERHOEVEN & DE MOOR 1971/72, MASSA & MARTINI 1971/72, MANGAN & MAINWARING 1971/72, TVETER 1971).

Untersuchungen von FANG und LIAO (1969) mit Cyproteron (PEETS, HENSON & NERI 1974, LIAO, HOWELL & CHANG 1974) und mit Flutamid haben gezeigt, daß zumindest diese beiden Antiandrogene - und es sind die potentesten, die bisher bekannt sind - in vivo und in vitro die Retention von Dihydrotestosteron im Prostatagewebe bzw. in den Prostatazellkernen hemmen. Diese Untersuchungen wurden an Ratten durchgeführt.

Die gleichen Autoren konnten ferner zeigen, daß die Bildung des Dihydrotestosteron spezifisch bindenden β -Proteins (Komplex II) in vivo und in vitro durch Antiandrogene, wie Cyproteron und Flutamid, gehemmt wird.

Ganz offensichtlich verhindern Antiandrogene die Bildung des nuklearen Dihydrotestosteron-Protein-Chromatin-Kom-

plexes durch kompetitive Interferenz am cytoplasmatischen und nuklearen Rezeptor.

1.4 Problemstellung

Es wurde von der Vorstellung ausgegangen, daß in allen androgen-abhängigen Organen spezifische Rezeptoren für Hormone vorhanden sind. Zu den androgenabhängigen Organen gehören auch die Talgdrüsen und den Talgdrüsen vergleichbare Organe, wie das Costovertebralorgan des Hamsters, die Präputialdrüse der Ratte und Maus und die Abdominaldrüse des mongolischen Gerbils.

Auf Grund der in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Ergebnisse über den Stand der Androgenrezeptorforschung wurde ferner davon ausgegangen, daß die spezifischen Androgenrezeptoren in allen androgen-abhängigen Organen identisch sind.

Ziel dieser Untersuchungen war es, primär zu überprüfen, ob auch in der Abdominaldrüse von Gerbils androgen-bindende Proteine auftreten und im positiven Falle (Rezeptornachweis) zu untersuchen, ob Androgene durch das Antiandrogen Cyproteronacetat aus der Rezeptorbindung verdrängt werden können.

Um die Validität dieser Methodik zu überprüfen, wurden zunächst Untersuchungen zum Nachweis des Androgen-Cytosol-Rezeptors in der Ratten- und Gerbilprostata durchgeführt. Der Nachweis von Rezeptoren in der Prostata von Gerbils wurde bisher nicht versucht.

Im Verlaufe dieser Arbeiten hat sich gezeigt, daß ein spezifischer Androgenrezeptor wohl in der Prostata von Ratten nachweisbar war, nicht aber in der Prostata und in der Abdominaldrüse des Gerbils. Aus diesem Grunde war es

auch nicht möglich, gezielte Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Androgene und von Cyproteronacetat beim Gerbil durchzuführen.

Obwohl kein Zweifel daran bestehen kann - dafür sprechen alle Befunde biologischer Tests - daß auch beim Gerbil die Funktion der Prostata androgenabhängig ist - gleiches gilt für die Abdominaldrüse - wurden die Androgenserumblutspiegel von Gerbils vor und nach Kastration mittels des Radioimmunoassays untersucht.

Um der Frage nachzugehen, ob Gerbils überhaupt Bindungsproteine für Hormone aufweisen, wurde auch der Nachweis von Östrogen-bindenden Proteinen im Uterus weiblicher Tiere sowie im Blutplasma versucht.

11. MATERIAL und METHODEN

2.1 Tiermaterial

Es wurde mit männlichen Ratten, mit einem Gewicht von 300 bis 400 g sowie männlichen und weiblichen Gerbils, mit einem Gewicht von 60 bis 70 g respektive 50 bis 60 g gearbeitet. Die Tiere erhielten Altromin-Futter und Wasser ad libitum. Alle Tiere wurden 20 bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn kastriert, um zu gewährleisten, daß keine endogenen Hormone (Androgene respektive Östrogene) an die Rezeptoren gebunden sind, d.h. es wird dadurch sichergestellt, daß androgen- oder östrogen-bindende Proteine für die Bindung exogen zugeführter Androgene respektive Östrogene zur Verfügung stehen.

--- Organ- und Cytosolgewinnung

20 bis 24 Stunden nach der Kastration wurden die Versuchstiere durch Äthernarkose betäubt und danach dekapiert.

Männliche Ratten: Es wurde nur die ventrale Prostata präpariert und entnommen.

Männliche Gerbils: Es wurden ventrale und dorsale Prostata sowie die Abdominaldrüse präpariert und entnommen.

Weibliche Gerbils: Es wurden Tuben und Uteri entnommen.

Da Rezeptor-Proteine wärmelabil sind, wurden die gewonnenen Organe nach Befreiung vom anhaftenden Fettgewebe sofort in eisgekühlte Sucroslösung überführt. Im Kühlraum wurden die Organe bei 4° C auf Fliespapier getrocknet, gewogen und ca. 1 1/2 Minuten mit einer Schere grob zerkleinert. Den zerkleinerten Organen wurde entsprechend ihrem Gewicht (in Gramm) ein bestimmtes Volumen (in ml)

Tris-HCL-Puffer (pH 7.5), im Verhältnis 1:1, zugegeben. Daran schloß sich die Homogenisierung des Gewebes an. Prostatagewebe: Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 400 UpM (Umdrehungen pro Minute) 5 x 2 strokes, zwischen je 2 strokes 1 Minute Pause, insgesamt 5 strokes.

Abdominaldrüsengewebe: Die Homogenisierung erfolgte mittels des Ultraturrax TP/18/2 bei 3000 bis 4000 UpM.

Die Homogenate wurden in der präparativen Ultrazentrifuge Modell Spinco L-50 in einem Festwinkelrotor 1 1/2 Stunden bei 100.000 g = 41.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, er ist das Cytosol (= 100.000 g Überstand des Homogenats).

2.3 Inkubation des Cytosols

Da Rezeptor-Proteine wärmelabil sind, mußte die Inkubation in einer Kühlkammer bei 4° C vorgenommen werden. Das geschah im Schüttelbad. Es wurden 9 Volumenteile Cytosol mit 1 Volumenteil Hormon-Lösung im Reagenzglas gemischt. Die Inkubationsdauer betrug 2 Stunden.

2.4 Dichtegradientenzentrifugation and Fraktionierung

30 %ige (7.5 g Glycerin ad 25 ml Tris) und 10 %ige (2.5 g Glycerin ad 25 ml Tris) Glycerinlösungen werden in einem System, das nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren arbeitet, miteinander vermischt. Pro Gradient sind 2.6 ml der 10 %igen und 2.4 ml der 30 %igen Glycerin-Tris-Lösung erforderlich. Frühestens 5, spätestens 20 Stunden nach Herstellung der Gradienten wurde ein Teil (0.1 bis 0.2 ml) des inkubierten Cytosols auf den Gradienten aufgetragen. Anschließend wurden die Gradienten in der Ultrazentrifuge Omega 11 im Titan⁶⁰-Schwenkbecherrotor 16 Stunden bei

45.000 UpM zentrifugiert. Die Sedimentation des Cytosol-Protein-Komplexes erfolgt bei 3.5 ± 0.3 Svedberg-Einheiten (LIAO & FANG 1969).

Mittels einer Perpex Peristaltic-Pumpe (LKB) wurden die Gradienten fraktioniert. Zwölf Tropfen ergeben eine Fraktion. Sie wurden in einem Packard-Gefäß aufgefangen.

1.5 Gelfiltration

Diese Methodik beruht auf der Säulen-Chromatographie-Technik. Im vorliegenden Falle wurde mit Sephadex G-100 gearbeitet. Die Sephadex-Körner bestehen aus quervernetzten hydrophilen Polysaccharidketten. Sie besitzen ein dreidimensionales Netzwerk bestimmter Maschengröße, das durch den Vernetzungsgrad bestimmt wird. Substanzen mit einem Molekulargewicht oberhalb des Vernetzungsgrades können nicht in das Netzwerk eindringen und verlassen deshalb die Säule zuerst, während Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht durch das Netzwerk diffundieren und erst - je nach Größe - später, mehr oder weniger verzögert, die Säule verlassen.

Die Säulen wurden mit Prostata- oder Abdominaldrüsen-cytosol beschickt, das mit ^3H -markiertem Dihydrotestosteron allein bzw. zusätzlich mit Cyproteronacetat inkubiert worden war. Laufzeit der Säule: Pro Fraktion 1800 sec. Anschließend wurde mit Hilfe des Spectralphotometers PMQ II bei einer Wellenlänge von 276 nm eine OD-Bestimmung (optical density) durchgeführt. Dieser Bestimmung schloß sich eine Radioaktivitätsmessung an.

2.6 Radioaktivitätsmessung

Nach der Fraktionierung der Dichtegradienten wurden die Packard-Gefäße mit 10 ml wasserlöslichem Scintillator

(= Bray's Solution) aufgefüllt. Die Radioaktivität wurde im Tri-Carb-Scintillations-Spectrometer Modell 33 75 gemessen.

2.7 Angewandte Substanzen, Puffer und Lösungen

2.7.1 Markierte Substanzen

^3H -DHT (5 α -Androstan-17 β -ol-3-on = Dihydrotestosteron)
Konzentration im Ansatz: 2×10^{-8} mol/l Cytosol

^3H -Testosteron
Konzentration im Ansatz: 2×10^{-8} mol/l Cytosol

^3H -Östradiol
Konzentration im Ansatz: 2×10^{-8} mol/l Cytosol

2.7.2 Nicht markierte Substanzen

Cyproteronacetat (17 α -Acetoxy-6-chlor-1,2 α -methylen-4,6-pregnadien-3,20-dion)
Konzentration im Ansatz: 2×10^{-7} mol/l Cytosol

Östradiol
Konzentration im Ansatz: 2×10^{-6} mol/l Cytosol

2.7.3 Puffer und Lösungen

Tris-HCL-Puffer = 2 Amino-2-(hydroxymethyl)-propandiol-
(1.3), pH 7.5 0.01 mol/l

Sucroselösung = 8.55 g Saccharose ad 100 ml Aqua dest.
0.25 M

Bray's Solution = 400 g Naphthalin. 40 g 2.5-Diphenyl-oxazol (PPO). 1 g 2.2-p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol) (PoPoP), gelöst in 4 Liter Dioxan

2.8 Radioimmunologische Bestimmung von Testosteron

2.8.1 Prinzip des Radioimmunoassays

Beim Radioimmunotest sind zum Nachweis eines Hormons spezifische Antikörper gegen das betreffende Hormon (Antigen) notwendig. Antikörper und Hormon (= Antigen) bilden einen Antikörper-Hormon-Komplex. Das Prinzip des Testes basiert auf einer Konkurrenzreaktion von radioaktiv-markiertem und nicht-markiertem (zu messenden) Hormon um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper.

In Abbildung 6 ist das Testmodell schematisch dargestellt.

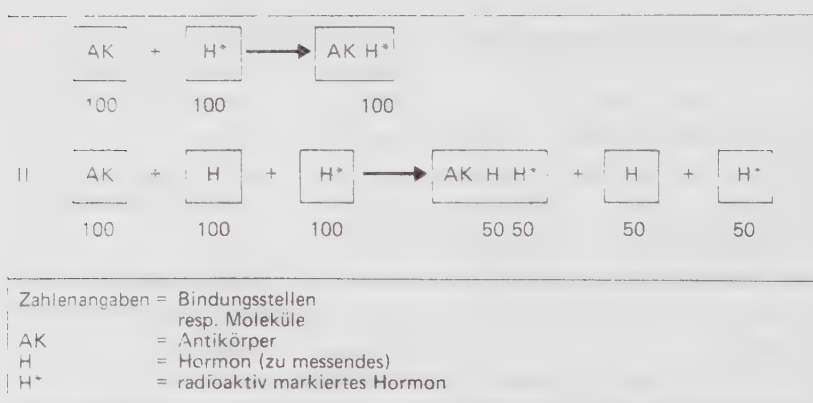


Abb. 6 Prinzip des Radioimmunoassays

Geht man davon aus, daß ein Antikörper (AK) 100 Bindungsstellen aufweist, dann ist er in der Lage, 100 Moleküle

des zu messenden Hormons bzw. des radioaktiv-markierten, zugesetzten Hormons zu binden (s. Abbildung 6, I). Läßt man jedoch den Antikörper mit radioaktiv unmarkiertem Hormon reagieren - wie es in Abbildung 6, II dargestellt ist - dann stehen nicht mehr genügend Bindungsstellen zur Verfügung. In diesem konkreten Beispiel stehen 100 Bindungsstellen des Antikörpers 200 Moleküle an Hormon gegenüber. Da der Antikörper gleiche Affinität zu dem markierten und nicht-markierten (zu messenden Hormon) hat, werden nur jeweils 50 Moleküle gebunden und je 50 Moleküle des radioaktiv zugesetzten sowie des zu messenden Hormons werden nicht gebunden und bleiben frei. Je größer die zugegebene Menge des unmarkierten Antigens (des zu messenden Hormons) ist, desto weniger radioaktive Moleküle können an den Antikörper gebunden werden und umso höher wird der freie Anteil des Antigens sein. Durch Parallelansätze mit definierten Mengen eines Antigens (Hormons) ist es möglich, Eichkurven zu erstellen (s. Abbildung 7). Der Hormongehalt einer zu messenden Probe kann dann unter Zuhilfenahme der Eich- oder Standardkurve abgelesen werden.

Wichtig für das Test-Prinzip ist die Trennung des freien von dem gebundenen Hormon. Es gibt dazu verschiedene Methoden. Sehr bewährt hat sich für diesen Zweck Holzkohle. Man mißt nun entweder die an den Antikörper gebundene Radioaktivität oder die sogenannte freie Radioaktivität, d.h. die Aktivität des nicht an den Antikörper gebundenen Hormons.

1.3.2 Praktische Durchführung des Radioimmunotests zur Testosteron

ANTIKÖRPER: Als Antikörper wurde anti-Testosteron-3-hydroxy-carboxy-methyl-oxim-BSA (bovine serum albumin) in einer Verdünnung 1: 3500 eingesetzt. Nennenswerte

Kreuzimmunitäten bestehen zu den Steroiden 5 α -Androstan-17 β -hydroxy-3-on (30 %), Androst-5-en-3,3,17 β -diol (14 %) und 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol (18 %).

TRACER: (1,2,6,7- ^3H)-Testosteron (^3H -Testosteron) mit einer spezifischen Aktivität von 94 Ci/m mol. (Fa. Amersham Buchler TRK 402).

STANDARDKURVE: Die Standardkurve wurde mit chromatographisch gereinigtem Testosteron angesetzt.

PUFFERSYSTEME: a) 10 m Molarer Phosphatpuffer + 0.1 % Gelatine pH 7.6, b) 10 m Molarer Phosphatpuffer + 0.5 % Gelatine pH 7.6.

TRENNUNG VON GEBUNDENEM UND FREIEM HORMON: Die Trennung der am Antikörper gebundenen ^3H -Testosteron vom freien ^3H -Testosteron erfolgte mit einer Charcoal-Dextran-Suspension (CDS), (400 mg Dextran 110 + 2.5 g Aktivkohle ad 1 L Puffer A).

Nach Pelletierung der Aktivkohle durch Zentrifugieren (1500 x g) befindet sich der absorbierte, nicht am Antikörper gebundene Anteil des Tracer, im Sediment. Der Überstand, der die am Antikörper gebundenen Tracerliganden enthält, wurde dekantiert, mit Scintillatorcocktail (10 ml Instagel) emulgiert und die Radioaktivität als Zerfälle pro Minute im Scintillationsspektrophotometer (Fa. Packard Mod. 544) gemessen.

TECHNIK DER SERUMGEWINNUNG: Die Versuchstiere wurden dekapiert, das Blut bis zum Abschluß der Gerinnung (ca. 1 1/2 Std.) im Eisbad deponiert, zentrifugiert (10 Min. bei 1500 x g) und das Serum bis zum Zeitpunkt der Testosteronbestimmung bei -30° C eingefroren.

DURCHFÜHRUNG: (1) 200 μl Serum bzw. Standardtestosteron

(Bereich 7.8 pg - 1 ng) mit 4 ml frisch destilliertem Äther extrahieren,

- (2) Trennen der Ätherphase vom wässrigen Anteil durch Zentrifugieren (1500 x g),
- (3) Einfrieren der wässrigen Schicht im Methanol-Trockeneisbad,
- (4) Dekantieren der testosteronhaltigen Ätherphase,
- (5) Evaporieren des Lösungsmittels,
- (6) Aufnehmen des Rückstandes in 200 µl Puffer A,
- (7) 100 µl Antikörperverdünnung (in Puffer A) pipettieren und
- (8) mit 100 µl tritiiertem Testosteron durchmischen. Der Tracer sollte so eingestellt sein, daß 10^4 DPM in 100 µl Lösung (Puffer A) enthalten sind.
- (9) Für 16 Stunden bei 4° C inkubieren und
- (10) die Proben ins Eisbad transferrieren.
- (11) 100 µl Puffer B pipettieren,
- (12) Ansatz mit 1 ml CDS gut durchmischen und sofort zentrifugieren (1500 x g).
- (13) Dekantieren, Messen der Impulsrate und prozentualen Tracer uptake kalkulieren.

BESTIMMUNG DER HORMONKONZENTRATION: Die Bestimmung der unbekannten Serumtestosteronkonzentration erfolgte aus der zu jedem Ansatz mitlaufenden Standardkurve. Diese ergibt sich aus der für einen bestimmten Bereich gültigen proportionalen Abnahme der Impulsrate mit steigender Testosteronkonzentration. Der typische Verlauf einer solchen Standardkurve wird in der nachstehenden Abbildung 7 demonstriert.

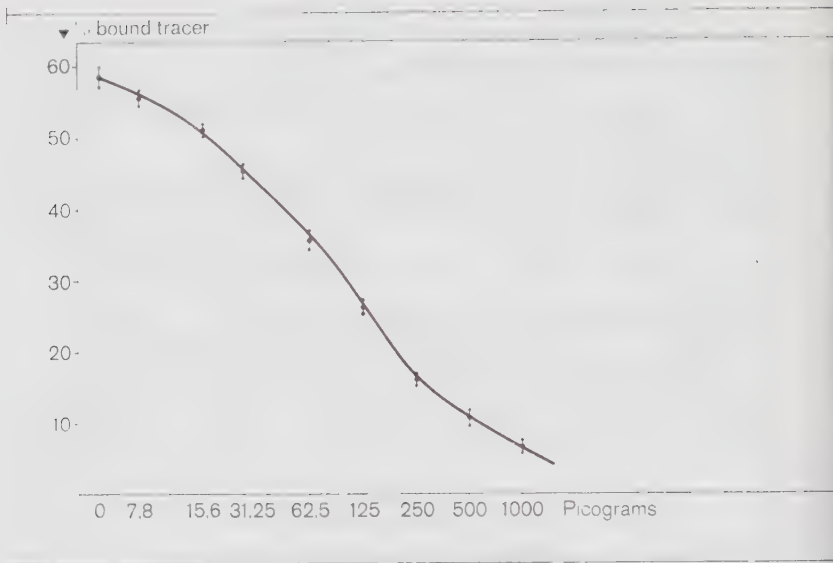


Abb.7 Radioimmunotest, Standardkurve für Testosteron

III.

ER G E B N I S S E

3.1 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Rattenprostatae (100.000 g Überstand des Cytoplasmas)

Wie im Abschnitt Problemstellung ausgeführt, sollten diese Untersuchungen nur dazu dienen, die Validität des Testsystems zu überprüfen. Inkubiert wurde mit ^3H -Dihydrotestosteron allein bzw. zusätzlich mit Cyproteronacetat (Details hierzu s. unter MATERIAL und METHODEN).

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 8 dargestellt und entsprechen den in der Literatur berichteten Untersuchungen (LIAO & FANG 1969).

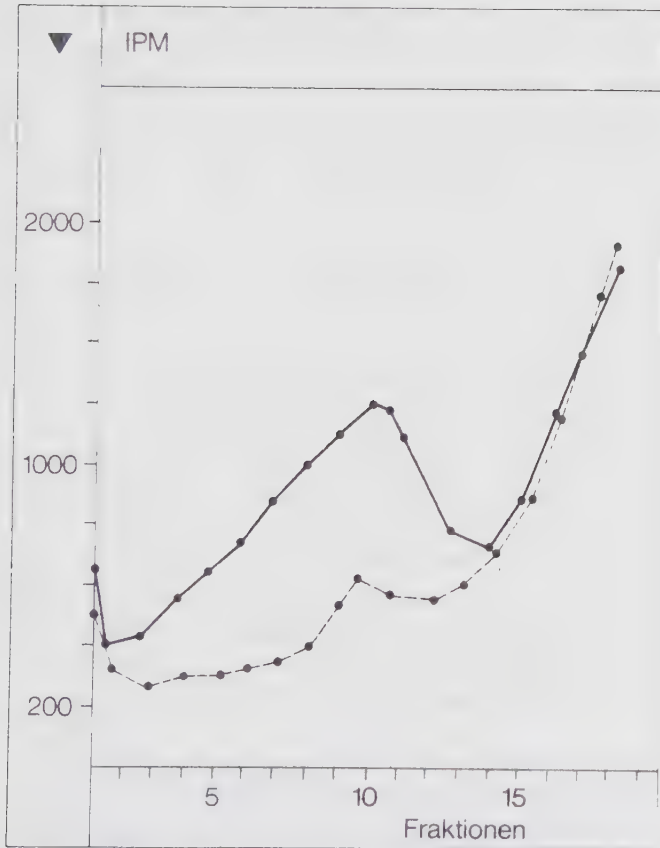


Abb.8 Nachweis des Dihydrotestosteron-Cytosol-Komplexes im Cytosol aus ventraler Rattenprostata (ausgezogene Kurve) und Hemmung der Hormon-Rezeptor-Komplex-Bildung durch zusätzliche Inkubation mit Cyproteronacetat (für nähere Erläuterungen s. MATERIAL und METHODEN).

Dihydrotestosteron wird an das Rezeptorprotein gebunden, der Hormon-Protein-Komplex erscheint in der 8. Fraktion mit einer Impulsrate von 1361 IMP (ausgezogene Kurve). Bei gleichzeitiger Inkubation von Cyproteronacetat wird die Bindung von Dihydrotestosteron an den spezifischen Cytosolrezeptor nahezu vollständig aufgehoben. Cyproteronacetat wirkt im Sinne eines kompetitiven Antagonisten und vermag Dihydrotestosteron oder Testosteron aus seiner spezifischen Proteinbindung zu verdrängen bzw. diese Bindung zu verhindern.

3.2 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Prostatagewebe des Gerbils

Es wurde die gleiche Versuchsanordnung beibehalten wie bei den Hormonbindungsversuchen mit Cytosol aus Rattenprostatatae, d.h. es wurde wieder mit ^3H -markiertem Dihydrotestosteron inkubiert. Daran an schloß sich die Fraktionierung und Radioaktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen. Die gefundenen Impulsraten sind in Abbildung 9 dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, ergaben sich keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines spezifischen hormonbindenden Proteins (vergleiche dazu Abbildung 8). Auch Wiederholungsversuche verliefen negativ.

In der Annahme, daß die Ausscheidung endogener Androgene beim Gerbil verzögert vor sich geht (es handelt sich um ein Wüstentier mit geringer Wasseraufnahme und Ausscheidung eines hochkonzentrierten Harns) und somit die Rezeptoren 20 bis 24 Stunden nach Kastration möglicherweise noch von den endogenen Hormonen besetzt sind, wurde die Zeit von erfolgter Kastration bis zur Gewebsentnahme von 24 Stunden auf 72 Stunden verlängert. Zusätzlich wurde zur besseren Trennung von hormonbindenden Proteinen und Albumin in einem weiteren Versuch eine Sephadex G 100 Gel-

filtration durchgeführt. Auch diese Versuche verliefen negativ und ergaben keinen Hinweis auf die Existenz eines spezifischen androgen-bindenden Rezeptors.

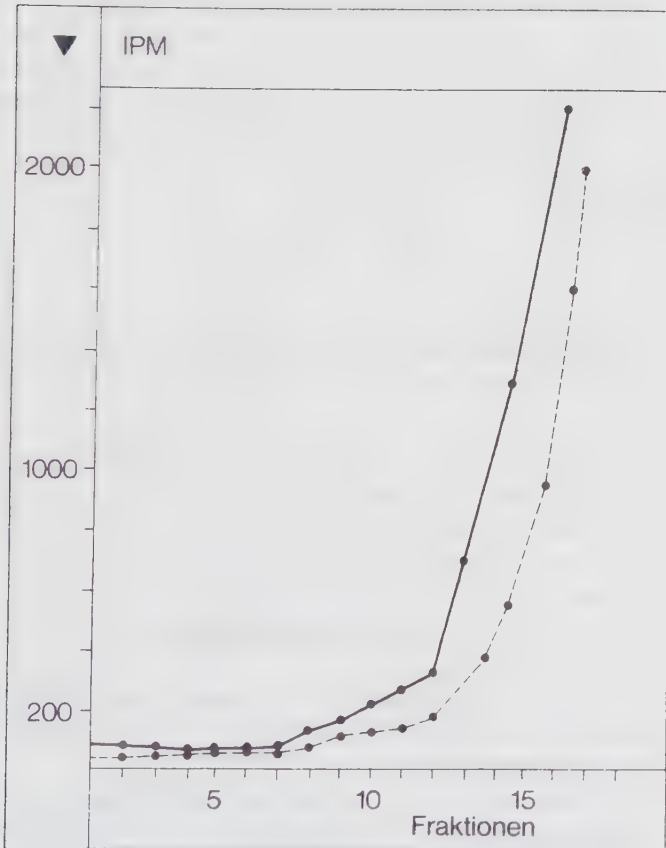


Abb. 9 Versuch eines Rezeptornachweises im Cytosol aus der Prostata (gestrichelte Kurve) bzw. Abdominaldrüse des Gerbils (durchgezogene Kurve). Inkubiert wurde mit ^3H -Dihydrotestosteron. Es ergibt sich kein Anhaltspunkt für das Vorkommen eines hormonbindenden Proteins.

3.3 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Abdominaldrüsen- gewebe des Gerbils

Diese Untersuchungen wurden analog den Hormonbindungsversuchen mit Cytosol aus Prostatagewebe des Gerbils durchgeführt, wobei auch die in diesem Abschnitt aufgezeigten Überlegungen in den Versuchsanordnungen berücksichtigt wurden. Wie beinahe schon zu erwarten war, verliefen auch diese Untersuchungen negativ, d.h. es gelang nicht, ein Rezeptorprotein in der Abdominaldrüse des Gerbils nachzuweisen.

3.4 Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Uterus und Abdo- minaldrüsengewebe weiblicher Gerbils

Dieser Versuch war dazu angelegt, ein östrogen-bindendes Protein nachzuweisen. Inkubiert wurde mit ^3H -markiertem Dihydrotestosteron und mit ^3H -markiertem Östradiol allein oder nach Zusatz von kaltem Östradiol. Kaltes Östradiol wurde in 100-fachem Überschuß zugefügt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 wiedergegeben.

Im Cytosol aus Uterusgewebe konnte ein östrogen-bindendes Protein nachgewiesen werden (s. dicke ausgezogene Kurve in Abbildung 10).

Bei gleichzeitiger Inkubation mit ^3H -markiertem Östradiol und kaltem Östradiol fällt der Rezeptor-Peak vergleichsweise geringer aus (dünne ausgezogene Kurve in Abbildung 10).

Ein spezifisches androgen-bindendes Protein (Inkubation mit ^3H -Dihydrotestosteron) konnte im Uterus-Cytosol nicht nachgewiesen werden (gestrichelte Kurve in Abbildung 10).

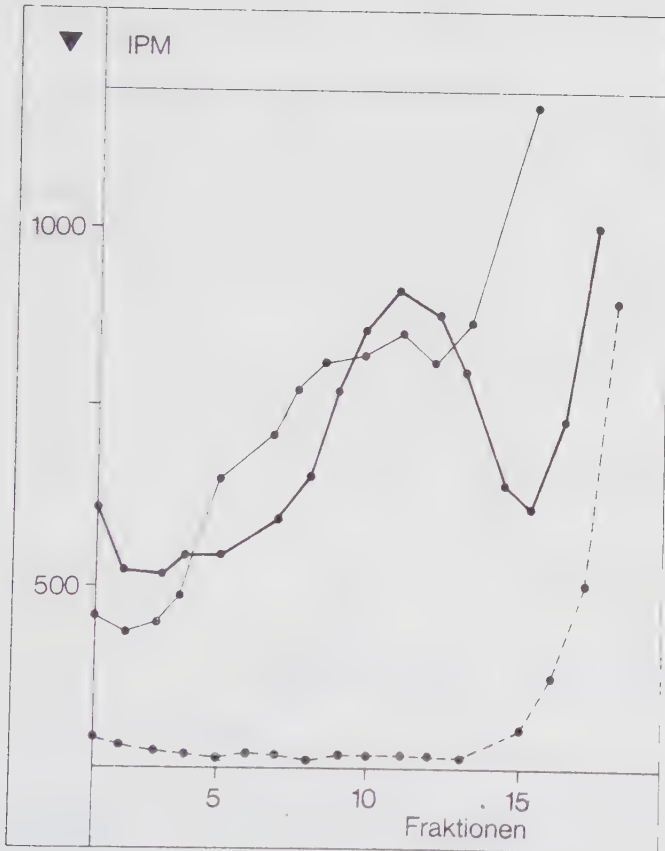


Abb.10

Nachweis eines hormonbindenden Proteins im Cytosol aus Uterusgewebe des Gerbils, inkubiert mit ^3H -Östradiol (dicker ausgezogene Kurve) und Hemmung der Hormon-Rezeptor-Bindung durch Zusatz von kaltem Östradiol in das Inkubationsmedium (dünn ausgezogene Kurve). Für das Vorkommen eines dihydrotestosteron-bindenden Rezeptors im Uterusgewebe gibt es keinen Hinweis (gestrichelte Kurve). (Nähere Details zur Methodik s. MATERIAL und METHODEN.)

3.5 Hormonbindungsversuche mit Blutplasma von männlichen und weiblichen Gerbils

Diese Versuche sollten zeigen, ob Gerbils ein 'sex hormone binding globulin' (SHGB) besitzen oder nicht. Dazu wurde, ähnlich wie bei den Hormonbindungsversuchen mit Cytosolen aus Prostata oder Abdominaldrüse, Blutplasma mit ^3H -Dihydrotestosteron respektive ^3H -Östradiol inkubiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 11 wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß im Blutplasma weiblicher und männlicher Gerbils Bindungsproteine sowohl für Dihydrotestosteron als auch Ostradiol vorhanden sind. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich um SHGB (Sex Hormone Binding Globulin).

3.6 Testosteronbestimmung im Plasma männlicher Ratten und Gerbils mittels des Radioimmunotests

Diese Untersuchungen wurden auf Grund der negativen Hormonbindungsversuche mit Cytosol aus Prostata- und Abdominaldrüsengewebe des Gerbils begonnen. Sie sollten dazu dienen, die Ausscheidungsgeschwindigkeit von endogenem Testosteron nach Kastration zu ermitteln.

Für die Ratte sind derartige Untersuchungen schon durchgeführt worden. Hier sollten sie nur dazu dienen, die Validität des Radioimmunotests zu überprüfen.

Blutabnahmen erfolgten 24 Stunden vor der Kastration, am Tag der Kastration und dann 24, 48, 72, 96 respektive 120 Stunden nach Kastration. Pro Gruppe gelangten je 5 Tiere in den Versuch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 wiedergegeben.

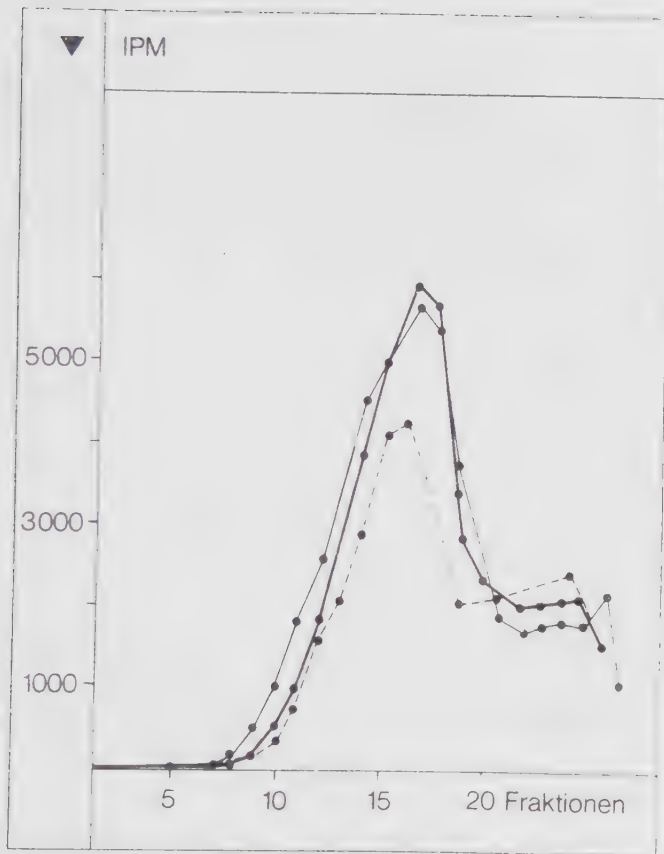


Abb.11

Nachweis eines androgen-bindenden Proteins im Blutplasma weiblicher und männlicher Gerbils.

Gestrichelte Kurve: Weibliche Gerbils, inkubiert wurde mit ^3H -Dihydrotestosteron.
 Dünn ausgezogene Kurve: Weibliche Gerbils, inkubiert wurde mit ^3H -markiertem Östradiol.
 Dick ausgezogene Kurve: Männliche Gerbils, inkubiert wurde mit ^3H -Dihydrotestosteron.
 Wahrscheinlich ist dieses androgen-bindende Protein im Blut identisch mit dem Sex Hormone Binding Globulin (SHGB).

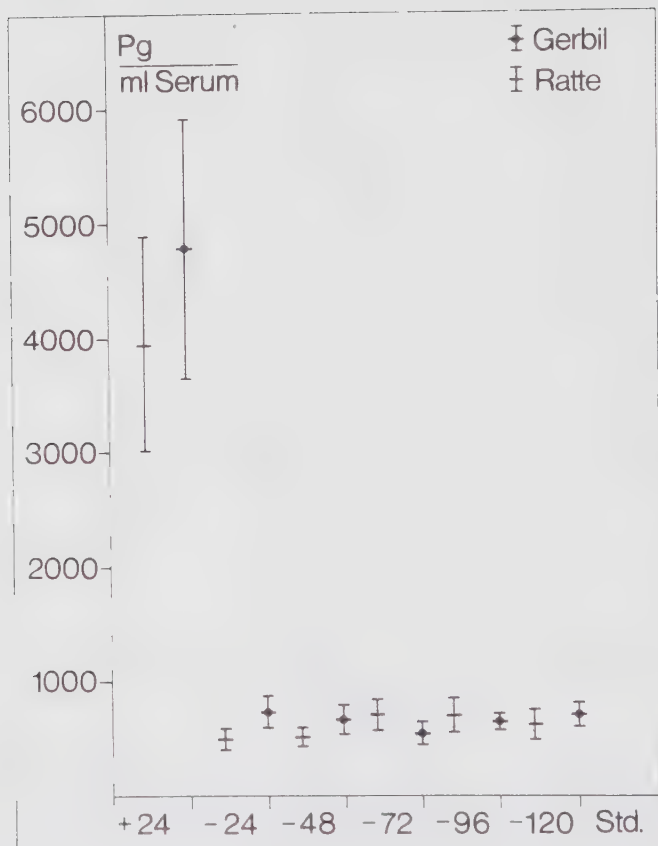


Abb.12 Messung der Testosteronserumspiegel bei der Ratte und beim Gerbil vor und nach Kastration. Es zeigte sich, daß bereits 24 Stunden nach Kastration die Testosteronserumspiegel bei Ratte und Gerbil gleichermaßen stark abgefallen sind.

Die Normalwerte für Gerbils und Ratten liegen zwischen 4000 und 5000 pg/ml Serum.

Bereits 24 Stunden nach Kastration liegen die Serumtestosteronwerte unter 1000 pg/ml. Die Ausscheidungsrate respektive Geschwindigkeit ist bei beiden Spezies identisch. Endogene Androgene scheiden also als möglicher Störfaktor für den negativen Ausgang der Bindungsstudien mit Cytosol aus Gerbilprostata- und Abdominaldrüsengewebe aus.

IV.

D I S K U S S I O N

Es war das Ziel der durchgeführten Untersuchungen, Bindungsproteine für Androgene in der Prostata und der Abdominaldrüse des mongolischen Gerbils nachzuweisen. Dieses Ziel wurde nicht erreicht. Weder für die Prostata noch für die Abdominaldrüse ergaben sich Hinweise für die Existenz spezifischer androgen-bindender Proteine.

Wie können nun die negativen Ergebnisse interpretiert werden?

Kein Zweifel kann daran bestehen, daß die Funktion der Prostata auch beim Gerbil androgen-abhängig ist. Auch die Abdominaldrüse, die im Aufbau einem großen Talgdrüsenkomplex ähnelt, ist in ihrer Funktion und Ausbildung androgen-abhängig (NEUMANN, VON BERSWORDT-WALLRABE, ELGER, STEINBECK, HAHN & KRAMER 1970).

Mit der angewandten Methodik, wie sie erstmals von LIAO und FANG (1969) beschrieben wurde, gelang der Nachweis eines spezifischen Bindungsproteins für Dihydrotestosteron in der Rattenprostata, d.h. an der Validität der angewandten Methodik kann kein Zweifel bestehen.

Es stellt sich die Frage, ob möglicherweise beim Gerbil 5α -Dihydrotestosteron nicht das physiologischerweise wirksame Androgen ist bzw. ob beim Gerbil in den Erfolgsorganen für Androgene die 5α -Reduktase fehlt (was in dieser Arbeit nicht untersucht wurde).

Lange Zeit glaubte man, daß nur 5α -DHT biologisch wirksam ist. Für die Universalität dieser zunächst an der Rattenprostata von FANG und LIAO (1969) erhobenen Befunde - selektive Retention von Dihydrotestosteron in Prostatazellkernen, Bindung von Dihydrotestosteron an spezifische Proteine (s. auch EINLEITUNG) - spricht, daß ganz ähnliche Proteine in einer Vielzahl androgen-empfindlicher

Organe gefunden wurden, so z.B. in den Samenblasen (TVETER & UNHJEM 1969, STERN & EISENFELD 1969, LIAO, THYMOCZKO, LIANG, ANDERSON & FANG 1971), in Haarfollikeln (FAZEKAS & SANDOR 1973), Talgdrüsen und Präputialdrüsen (ADACHI & KANO 1972, EPPENBERGER & HSIA 1972, BULLOCK & BARDIN 1970, MAINWARING & MANGAN 1973), im Uterus (JUNGBLUT, HUGHES, GORLICH, GOWERS & WAGNER 1971), der Niere (GEHPING, TOMKINS & OHNO 1971, RITZEN, NAYFEH, FRENCH & ARONIN 1972), der Submandibulardrüse (GOLDSTEIN & WILSON 1972, DUNN, GOLDSTEIN & WILSON 1973), in verschiedenen androgen-empfindlichen Tumoren (Shionogi Karzinom), ja sogar im Gehirn.

Auch in der menschlichen Prostata scheint ein spezifischer Rezeptor für Dihydrotestosteron vorzukommen (HANSSON, TVETER, ATTRAMADAL & TORGENSEN 1971, HANSSON, TVETER, UNHJEM & DJÖSELAND 1972, GELLER & WORTHMAN 1973, MAINWARING & MILROY 1973, FANG 1973).

Der Dihydrotestosteron-Rezeptor-Komplex in menschlichen Prostatazellkernfraktionen sedimentiert als 3 S.

Es gibt aber auch eine ganze Reihe von Hinweisen, die die Universalität dieses Konzeptes in Frage stellen. So gelang es bisher nicht, in der Skelettmuskulatur einen eindeutigen Androgenrezeptor nachzuweisen (MAINWARING & MANGAN 1973, AAKVAAG, TVETER, UNHJEM & ATTRAMADAL 1972). Eine Ausnahme davon machen der Musculus levator ani des Meerschweinchens und der Ratte, der Musculus masseter des Meerschweinchens und der Musculus cremaster des Bullen (MAINWARING & MANGAN 1973). In den letztgenannten Muskeln gelang der Nachweis von Androgen-Rezeptoren. Für die Wahrscheinlichkeit, daß in manchen Organen Dihydrotestosteron-Rezeptormechanismen nicht für die Auslösung der androgenen Wirkung verantwortlich sind, sprechen eine Reihe weiterer Befunde. So gelingt es bei kastrierten Ratten nicht, mit Dihydrotestosteron Libido und Potenz aufrechtzuerhalten, wohl aber mit Testosteron, Androstendion und

- im begrenzten Umfang - sogar mit biologisch schwach wirksamen Androgenen, wie z.B. dem 19-Hydroxytestosteron (WHALEN & LUTTGE 1971b, BEYER, LARSSON, PÉREZ-PALACIOS & MORALI 1973). Es gelingt mit Dihydrotestosteron ferner nicht, daß sogenannte "frühe Androgen-Syndrom" (EAS) bei weiblichen Ratten auszulösen, wohl aber mit Testosteron und einer Reihe anderer Androgene (WHALEN & LUTTGE 1971a). Auch die Differenzierung der Wolff'schen Gänge - ein androgen-abhängiger Vorgang - verläuft in Abwesenheit der 5 α -Reduktase-Aktivität normal (WILSON 1973). Auch die negativen Befunde dieser Arbeit lassen Zweifel an der Universalität des Dihydrotestosteron-Rezeptor-mechanismus aufkommen.

Eine mögliche Ursache für den negativen Ausgang der durchgeführten Experimente hatte auch in einer verminderten Ausscheidung der endogenen Androgene nach Kastration beim Gerbil sein können. Testosteronbestimmungen vor und nach der Kastration haben aber gezeigt, daß die Androgenserumblutspiegel beim Gerbil nach Kastration ebenso rasch abfallen wie bei der Ratte.

V.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es war das Ziel dieser Untersuchung, Androgen-Bindungsstudien mit Cytosolen aus Prostata- und Abdominaldrüsen-gewebe männlicher (Prostata) bzw. männlicher und weiblicher (Abdominaldrüse) Gerbils durchzuführen. Die in ihrer Funktion androgen-abhängige Abdominaldrüse des Gerbils entspricht im Aufbau einem großen Talgdrüsenkomplex und dient als Modell, um die Beeinflussung der Talgdrüsenfunktion durch Hormone (Androgene, Antiandrogene) zu messen. Diese Studie sollte weitere Informationen zur Androgenabhängigkeit dieses Organs erbringen.

Es wurde mit der von LIAO und FANG (1969) beschriebenen Methode gearbeitet. Die Cytosole wurden mit radioaktiv-markiertem Dihydrotestosteron bzw. radioaktivem Dihydrotestosteron und kaltem Cyproteronacetat inkubiert. Nach Dichtegradienten-Zentrifugation wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen, um so auf spezifische hormonbindende Proteine rückschließen zu können. Es gelang nicht, in den genannten Organen androgen-bindende Rezeptoren nachzuweisen. Dagegen ließen sich die an der Ratten-Prostata von LIAO und FANG (1969) erhobenen Befunde bestätigen.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß im Uterus weiblicher Gerbils ein östrogen-bindendes, aber kein androgen-bindendes Protein vorkommt. Dagegen gelang der Nachweis eines androgen-bindenden (Transport-)Proteins im Serum von Gerbils beiderlei Geschlechts. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das Sex Hormone Binding Globulin (SHGB).

Der negative Ausgang der Androgenbindungsversuche an Cytosolen aus Prostata und Abdominaldrüse des Gerbils ist

nicht auf eine bei dieser Spezies möglicherweise verzögerte Ausscheidung endogener Androgene nach Kastration zurückzuführen. Die radioimmunologische Messung der Testosteronserumspiegel vor und nach der Kastration ergab für Gerbils den gleichen Befund wie für Ratten. Bereits 24 Stunden nach Kastration sind die Testosteronwerte abgesunken.

Obwohl eine ganze Reihe von Untersuchungen für die Universalität des Dihydrotestosteron-Rezeptormechanismus sprechen, gibt es auch Befunde, die die Universalität dieses Konzeptes anzweifeln. Auch die in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse sprechen dagegen.

VI.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aakvaag, A., Tveter, K.J., Unhjem, O., and Attramadal, A.:
J. Steroid Biochem. 3, 375 (1972)
- Adachi, K., and Kano, M.:
Steroids 19, 567 (1972)
- Anderson, K.M., and Liao, S.:
Nature (London) 219, 277 (1968)
- Arnaud, M., Beziat, Y., Guilleux, J.C., Hough, A., Hough, D.,
and Mousseron-Canet, M.:
Biochim. Biophys. Acta 232, 117 (1971)
- Baulieu, E.E., and Jung, I.:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 599 (1970)
- Belham, J.E., Neal, G.E., and Williams, D.C.:
Biochim. Biophys. Acta 187, 159 (1969)
- Beyer, C., Larsson, K., Pérez-Palacios, G., and Morali, G.:
Horm. Behav. 4, 99 (1973)
- Brinkmann, A.O., Mulder, E., Lamers-Stahlhofen, G.J.,
Mechielsen, M.J., and van der Molen, H.J.:
FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.), Lett. 26, 301 (1972)
- Bruchovsky, N., and Wilson, J.D.:
J. Biol. Chem. 243, 2012 (1968)
- Bullock, L.P., and Bardin, C.W.:
J. Clin. Endocrinol. Metab. 31, 113 (1970)
- Burdick, K.H., and Hill, R.:
Brit. J. Derm. 82, Suppl. 6, 19 (1970)
- Callantine, M.R., Clemens, L.E., and Shih, Y.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 382 (1968)

De Graaf, H.J.:

Ned. T. Geneesk. 87, 1450 (1943)

Dunn, J.F., Goldstein, J.L., and Wilson, J.D.:

J. Biol. Chem. 248, 7819 (1973)

Ebling, F.J.:

J. Endocr. 5, 297 (1948)

Ebling, F.J.:

J. Endocr. 7, 288 (1951)

Ebling, F.J.:

J. Endocr. 10, 147 (1954)

Ebling, F.J.:

J. Embryol. exp. Morph. 5, 74 (1957 a)

Ebling, F.J.:

J. Endocr. 15, 297 (1957 b)

Ebling, F.J.:

J. Endocr. 38, 181 (1967)

Ebling, F.J.:

In: Briggs, M.H. (Ed.) "Advances in Steroids,
Vol. 2, pp. 1 - 39,
New York - London: Academic Press (1970 a)

Ebling, F.J.:

Brit. J. Derm. 82, Suppl. 6, 10 (1970 b)

Ebling, F.J.:

Acta endocr. (Kbh.) 72, 361 (1973)

Eppenberger, U., and Hsia, S.L.:

J. Biol. Chem. 247, 5463 (1972)

Erdos, T.:

Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 338 (1968)

Fang, S.:

Personal communication (1973)

Fang, S., Anderson, K.M., and Liao, S.:

J. Biol. Chem. 244, 6584 (1969)

Fang, S., and Liao, S.:

Mol. Pharmacol. 5, 428 (1969)

Fazekas, A.G., and Sandor, T.:

Proc. Int. Congr. Endocrinol., 4th, Washington, D.C.,
1972, p. 80 (Abstract) (1973)

Frost, P., and Gomez, E.C.:

In: Montagna, W., van Scott, E.J., and Stoughton, R.B.
(Eds.) "Advances in Biology of the Skin",
Vol. 12, pp. 403 - 420
Oxford: Pergamon Press (1972)

Gehring, U., Tomkins, G.M., and Ohno, S.:

Nature (London), New Biol. 232, 106 (1971)

Geist, S.H., Salmon, U.J., and Gaines, J.A.:

Endocrinology 23, 784 (1938)

Geller, J., and Worthman, C.:

Acta endocr. (Kbh.), Suppl. 177, 4 (1973)

Geynet, C., Millet, C., Truong, H., and Baulieu, E.E.:

Gynecol. Invest. 3, 2 (1972)

Glenn, E.M., and Gray, J.:

Endocrinology 76, 115 (1965)

Goldstein, J.L., and Wilson, J.D.:

J. Clin. Invest. 51, 1647 (1972)

Gräf, K.-J., Brotherton, J., and Neumann, F.:

In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H., and Welch, A.D.
(Eds.) "Handbuch der experimentellen Pharmakologie",

- Band 35/2, Kapitel VII, S. 485 - 542
Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag (1971)
- Gräf, K.J., and Neumann, F.:
Sexualmedizin 12, 762 (1975)
- Greenhill, J.P., and Freed, S.C.:
J.A.M.A. 112, 1573 (1939)
- Hamada, H., Neumann, F. und Junkmann, K.:
Acta endocr. (Kbh.) 44, 380 (1963)
- Hamilton, J.B., and Montagna, W.:
Amer. J. Anat. 86, 191 (1950)
- Hansson, V., Tveter, K.J., Attramadal, A., and Torgersen, O.:
Acta endocr. (Kbh.) 68, 79 (1971)
- Hansson, V., Tveter, K.J., Unhjem, O., and Djöseland, O.:
J. Steroid Biochem. 3, 427 (1972)
- Harding, B.W., and Samuels, L.T.:
Endocrinology 70, 109 (1962)
- Haskin, D., Lasher, N., and Rothman, S.:
J. invest. Derm. 26, 207 (1953)
- Hooker, C.W., and Pfeiffer, C.A.:
Endocrinology 32, 69 (1943)
- Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Hurst, D.J., Kawashima, T., and Jungblut, P.W.:
Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 56, 547 (1967)
- Jensen, E.V., DeSombre, E.R., and Jungblut, P.W.:
In: Wissler, R.W., Dao, J.L., and Wood, S. (Eds.)
"Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance"
p. 15,
Chicago, Illinois: Univ. of Chicago Press (1967)

- Jensen, E.V., and Jacobson, H.I.:
Recent Progr. Horm. Res. 18, 387 (1962)
- Jensen, E.V., Jacobson, H.I., Smith, S., Jungblut, P.W., and DeSombre, E.R.:
Gynecol. Invest. 3, 108 (1972)
- Jensen, E.V., Mohla, S., Brecher, P.I., and DeSombre, E.R.:
In: O'Malley, B.W., and Means, A.R. (Eds.)
"Receptors for Reproductive Hormones",
New York - London: Plenum Press (1973)
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E.,
Jungblut, P.W., and DeSombre, E.R.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 632 (1968)
- Jones, E.L., and Woodbury, L.:
J. invest. Derm. 43, 165 (1964)
- Jungblut, P.W., Hatzel, I., DeSombre, E.R., and Jensen, E.V.:
Colloq. Ges. Physiol. Chem. 18, 58 (1967)
- Jungblut, P.W., Hughes, S.F., Gorlich, L., Gowers, U., and
Wagner, R.K.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1603 (1971)
- Junkmann, K., and Neumann, F.:
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 90, 139 (1964)
- Kahwanago, I., Heinrichs, W.L., and Herrmann, W.L.:
Endocrinology 86, 1319 (1970)
- Karlson, P., and Sekeris, C.E.:
Deutsch Med. Wochenschr. 98, 831 (1973)
- Kepler, E.J., Watters, W., and Piper, M.C.:
Proc. Mayo Clin. 13, 353 (1938)
- Korenman, S.G., and Rao, B.R.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61, 1028 (1968)

Lapière, C.:

C. R. Soc. Biol. (Paris) 147, 1302 (1953)

Lawrenze, C.H., and Werthessen, N.T.:

Endocrinology 27, 755 (1940)

Liao, S., and Fang, S.:

Vitam. Horm. (New York) 27, 17 (1969)

Liao, S., and Fang, S.:

In: Griffiths, K., and Pierrepont, C.G. (Eds.)

"Some Aspects of Aetiology and Biochemistry of Prostate Cancer",

Cardiff: Alpha Omega Alpha Publ. (1970)

Liao, S., Howell, D.K., and Chang, T.M.:

Endocrinology 94, 1205 (1974)

Liao, S., Thymoczko, J.L., Liang, T., Anderson, K.M., and Fang, S.:

Advan. Biosci. 7, 155 (1971)

Litwack, G. (Ed.):

"Biochemical Actions of Hormones", Vol. 1,

New York: Academic Press (1970)

Litwack, G. (Ed.):

"Biochemical Actions of Hormones", Vol. 2,

New York: Academic Press (1972)

McKerns, K.M. (Ed.):

"The Sex Steroids, Molecular Mechanisms",

New York: Appleton (1971)

McKerns, K.M. (Ed.):

"Hormones and Cancer",

New York: Academic Press (1974)

Mainwaring, W.I.P.:

J. Endocrinol. 44, 323 (1969)

Mainwaring, W.I.P.:

In: Griffiths, K., and Pierrepoint, C.G. (Eds.)

"Some Aspects of Aetiology and Biochemistry of
Prostate Cancer"

Cardiff: Alpha Omega Alpha Publ. (1970)

Mainwaring, W.I.P., and Mangan, F.R.:

J. Endocrinol. 59, 121 (1973)

Mainwaring, W.I.P., and Milroy, E.J.G.:

J. Endocrinol. 57, 371 (1973)

Mangan, F.R., and Mainwaring, W.I.P.:

Gynecol. Invest. 2, 300 (1971/72)

Massa, R., and Martini, L.:

Gynecol. Invest. 2, 253 (1971/72)

Montagna, W., and Kenyon, P.:

Anat. Rec. 103, 365 (1949)

Neumann, F.:

Gynec. Invest. 2, 150 (1971/72)

Neumann, F., von Berswordt-Wallrabe, R., Elger, W.,

Steinbeck, H., Hahn, J.D., and Kramer, M.:

Recent Progr. Hormone Res. 26, 337 (1970)

Neumann, F., and Elger, W.:

J. invest. Derm. 46, 561 (1966)

Neumann, F., Elger, W., and Steinbeck, H.:

Phil. Trans. Roy. Soc., Lond. B 259, 179 (1970)

Neumann, F., and Kramer, M.:

Endocrinology 75, 428 (1964)

Neumann, F., Richter, K.-D. und Günzel, P.:

Zbl. Vet.-Med., Reihe A, 12, 171 (1965)

Neumann, F. und Steinbeck, H.:

In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H. und Welch, A.D.
(Eds.) "Handbuch der experimentellen Pharmakologie",
Band 35/2, Kap. VI, S. 235
Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag (1974)

Niu, M.C., and Segal, S.J. (Eds.):

"The Role of RNA in Reproduction",
Amsterdam: North-Holland Publ. (1974)

Noteboom, W.D., and Gorski, J.:

Arch. Biochem. Biophys. 111, 559 (1965)

O'Malley, B.W., and Means, A.R. (Eds.):

"Receptors for Reproductive Hormones", Vol. 36,
New York: Plenum (1973)

Pasqualini, J.R., and Scholler, R. (Eds.):

J. Steroid Biochem. 3 (1972)

Pearlman, W.H., and Pearlman, M.R.J.:

J. Biol. Chem. 236, 1321 (1961)

Peets, E.A., Henson, M.F., and Neri, R.:

Endocrinology 94, 532 (1974)

Pitot, H.C., and Yatvin, M.B.:

Physiol. Rev. 53, 228 (1973)

Pochi, P.E., Strauss, J.S., and Mescon, H.:

J. invest. Derm. 39, 475 (1962)

Puca, G.A., and Bresciani, F.:

Nature (London) 218, 967 (1968)

Raspé, G. (Ed.):

Advan. Biosci. 7 (1971)

Raspé, G. (Ed.):

Life Science Monographs 2 (1972)

Oxford - Edinburgh - New York: Pergamon Press, Vieweg

Rickenberg, H.V.:

"The Biochemistry of Hormones",
London: Med. Tech. Publ. Co. Butterworths (1974)

Ritzén, E.M., Nayfeh, S.N., French, F.S., and Aronin, P.A.:
Endocrinology 91, 116 (1972)

Rocheftort, H., and Baulieu, E.E.:

C. R. Acad. Sci., Ser. D 267, 662 (1968)

Sandberg, A.A., Kirdani, R.Y., Varkarakis, M.J., and
Murphy, G.P.:

Steroids 22, 259 (1973)

Saunders, H.L., and Ebling, F.J.:

J. invest. Derm. 52, 163 (1969)

Smellie, R.M.S. (Ed.):

"The Biochemistry of Steroid Hormone Action",
New York: Academic Press (1971)

Steinbeck, H., and Neumann, F.:

J. Repr. Fert. 26, 59 (1971)

Stern, J.M., and Eisenfeld, A.J.:

Science 166, 233 (1969)

Strauss, J.S., Klingman, A.M., and Pochi, P.E.:

J. invest. Derm. 39, 139 (1962)

Strauss, J.S., and Pochi, P.E.:

J. invest. Derm. 36, 293 (1961)

Strauss, J.S., and Pochi, P.E.:

Rec. Progr. Horm. Res. 19, 385 (1963)

Stumpf, W.E.:

Endocrinology 85, 31 (1969)

Talwar, G.P., Segal, S.J., Evans, A., and Davidson, O.W.:

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1059 (1964)

- Talwar, G.P., Sopori, M.L., Biswas, D.K., and Segal, S.J.:
Biochem. J. 107, 765 (1968)
- Tata, J.R.:
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 5, 191 (1966)
- Toft, D., and Gorski, J.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55, 1574 (1966)
- Tveter, K.J.:
Acta endocr. (Kbh.) 66, 352 (1971)
- Tveter, K.J., and Aakvaag, A.:
Endocrinology 85, 683 (1969)
- Tveter, K.J., and Attramadal, A.:
Acta Endocrinol. (Kbh.) 59, 218 (1968)
- Tveter, K.J., and Unhjem, O.:
Endocrinology 84, 963 (1969)
- Verhoeven, G., and de Moor, P.:
Gynecol. Invest. 2, 290 (1971/72)
- Walsh, P.C., and Korenman, S.G.:
J. Urol. 105, 850 (1971)
- Whalen, R.E., and Luttge, W.G.:
Endocrinology 89, 1320 (1971 a)
- Whalen, R.E., and Luttge, W.G.:
Horm. Behav. 2, 117 (1971 b)
- Whalen, R.E., Luttge, W.G., and Green, R.:
Endocrin. 84, 217 (1969)
- Williams-Ashman, H.G.:
Cancer Res. 25, 1096 (1965)
- Wilson, J.D.:
Endocrinology 92, 1192 (1973)

Wilson, J.D., and Gloyna, R.E.:

Recent Progr. Horm. Res. 26, 309 (1970)

VII.

D A N K S A G U N G

Für die Überlassung des Themas und die mir gewährte Beratung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit danke ich herzlich Herrn Professor Dr. F. Neumann.

Mein besonderer Dank gilt dem inzwischen leider verstorbenen Herrn Dr. H.-P. Anders, der mir tatkräftig bei der Durchführung und Auswertung aller Experimente geholfen hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Schwarz und Fräulein Blach für die Aufzucht und Betreuung der Versuchstiere.

Ebenfalls gilt mein Dank zahlreichen Mitarbeitern der Abteilungen Endokrinpharmakologie und Biologische Chemie, vor allen Dingen Fräulein Cunitz und Herrn Friedreich.

Am 2. Oktober 1943 wurde ich als Sohn des Dr. med. Karl Schwalm und seiner Ehefrau Katharina, geb. Graffmann, in Salzwedel geboren.

Von 1951 bis 1965 Besuch der Volksschule und des Gymnasiums mit Abiturabschluß in Duisburg-Meiderich. Bei der Bundeswehr diente ich als Wehrpflichtiger von 1965 bis 1967.

1967 Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin.

1968 Naturwissenschaftliche Vorprüfung.

1969 Ärztliche Vorprüfung und

1973 Medizinisches Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

Seit Absolvierung meiner Medizinalassistentenzeit am 30. April 1974 in Berlin bin ich als Assistenzarzt im Städtischen Krankenhaus Steglitz beschäftigt.

Im Department für Endokrinpharmakologie und Biologische Chemie der Schering AG war ich seit Juni 1971 als Doktorand tätig.

